

THESIS

BONN

1969

EINFLUSS VON TESTOSTERON
AUF DEN DNS-STOFFWECHSEL IN SEXUAL- UND
NICHTSEXUAL-ORGANEN UNREIFER RATTEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von
THOMAS ENGELS
aus
MARIENHEIDE

BONN 1969

EINFLUSS VON TESTOSTERON
AUF DEN DNS-STOFFWECHSEL IN SEXUAL- UND
NICHTSEXUAL-ORGANEN UNREIFER RATTEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

THOMAS ENGELS

aus

MARIENHEIDE

BONN 1969

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Bonn

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Karl-Oskar Mosebach

Korreferent: Prof. Dr. Dr. W. Dirscherl

Tag der mündlichen Prüfung: 1.4.1969

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Dirscherl)

Druck: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Meiner Mutter gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsübersicht

	Seite
Einleitung	7
Theoretischer Teil	8
Experimenteller Teil	14
A. Methodik	14
1. Versuchstiere und Injektionen	14
2. Aufarbeitung der Tiere	14
3. Zellfraktionierung	14
4. Isolierung der Nukleinsäuren	15
5. Bestimmung der RNS-Menge	17
6. Bestimmung der DNS-Menge	19
7. Radioaktivitätsbestimmungen	21
a) Flüssig-Szintillator-Technik	21
b) Schöniger-Verbrennung in Verbindung mit der Flüssig-Szintillator-Technik	22
c) Bestimmung der Radioaktivität in Gasphase	23
B. Ergebnisse	25
1. Einfluss von Testosteron auf den Wassergehalt der Vesikulardrüsen	25
2. Einfluss von Testosteron auf den DNS- und RNS-Gehalt der Vesikulardrüsen	26
3. Einfluss von Testosteron auf den zeit- lichen Verlauf der Aufnahme von $[2-^{14}\text{C}]$ - Thymin in die Vesikulardrüsen	27
4. Untersuchungen über den zeitlichen Beginn des Einflusses von Testosteron auf die Aufnahme von $[2-^{14}\text{C}]$ Thymin in die Vesikulardrüsen und einige andere Rattenorgane	28
5. Untersuchungen über die Lokalisation der gesteigerten $[2-^{14}\text{C}]$ -Thymin- Aufnahme in den Vesikulardrüsen	33

6. Untersuchungen über Austauschreaktionen an der DNS	35
7. Einige vergleichende Untersuchungen mit Methenolon	37
C. Diskussion	40
Zusammenfassung	42
Literatur	43

Einleitung

Zum biochemischen Mechanismus von Hormonwirkungen, dem übergeordneten Thema dieser Arbeit, gibt es im wesentlichen drei Theorien:

1. Hormonwirkung durch Kontrolle von Enzymaktivitäten,
2. Hormonwirkung durch Permeabilitätsänderungen an Zellmembranen und
3. Hormonwirkung durch Steuerung der Genfunktion (Genaktivierung).

Nach der Theorie der Genaktivierung, die erstmalig von Karlson 1961 aufgestellt wurde, beginnen Hormone ihre biochemische Wirkung mit der Förderung der Synthese von Messenger-RNS in den Erfolgsorganen. Inzwischen ist eine Reihe von Arbeiten angefertigt worden, die zeigen, dass zumindest die Synthese der Gesamt-RNS frühzeitig nach Applikation der interessierenden Hormone gesteigert wird. Über Einflüsse von Hormonen auf den DNS-Stoffwechsel, insbesondere auch über den Einfluss auf den Einbau markierter Vorstufen, ist demgegenüber kaum gearbeitet worden. Im Rahmen unserer Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus von Testosteron erschien es daher sinnvoll, auch auf mögliche Einflüsse dieses Hormons auf den DNS-Stoffwechsel von Erfolgsorganen und, im Vergleich dazu von Nicht-Erfallsorganen, zu achten. Es kam besonders darauf an, nicht nur Effekte schlechthin, sondern vor allem ihren zeitlichen Verlauf und ihre Zuordnung zueinander zu erfassen.

Theoretischer Teil

Die Karlson'sche Theorie der Genaktivierung (Karlson, 1961 und 1963), die weitgehend die Theorie von Jacob und Monod (1961) über die Regulation der Genaktivitäten durch sogenannte Repressoren verwertet, sei kurz erläutert:

Es wird angenommen, dass im Zellkern der grösste Teil der Gene durch spezifische Repressoren blockiert ist. Diese Repressoren können durch sogenannte Induktoren inaktiviert werden. Durch den Induktor sollen die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Repressoren so verändert werden, dass ihre Funktion, nämlich die Unterdrückung der DNS-abhängigen RNS-Synthese nicht mehr ausgeübt werden kann. Nach Karlson sollen Hormone Induktoreigenschaften haben. Als elektronenoptisch sichtbarer Ausdruck entwickelt sich dort, wo der Repressor durch den Induktor blockiert ist, ein sogenannter Puff (Beerman, 1964). Dieses puffing-Phänomen ist bei den Speicheldrüsenchromosomen der Insekten besonders ausgeprägt. Die Puffs sind Ausdruck der m-RNS-Synthese. Die m-RNS übernimmt die Information von der DNS und trägt sie in das Cytoplasma. Sie soll sich dort mit den Ribosomen verbinden und den Mechanismus der Proteinsynthese in Gang setzen. Als Ergebnis der Hormonwirkung erwartet man die Synthese spezifischer Proteine, z.B. Enzymproteine (Enzyminduktion).

Diese Theorie wurde bei Versuchen über den Einfluss verschiedener Steroidhormone auf den Nukleinsäurestoffwechsel und die Proteinsynthese gewonnen. Es wurde dabei die RNS ungleich stärker berücksichtigt als die DNS. Das gilt besonders für das Studium des Einbaus markierter Vorstufen. Wahrscheinlich wurde die RNS vorgezogen, weil von der DNS, die als Träger des genetischen Codes für konstant gehalten wird, weniger Informationen erwartet werden.

Uns erschien es sinnvoll zu sein, im Rahmen einer systematischen Erforschung des Einflusses von Steroidhormonen auf die Proteinsynthese, mit dem Studium möglicher Einwirkungen auf den DNS-Stoffwechsel zu beginnen, da keineswegs überblickt werden kann, ob und in welchem Umfang schon bekannt gewordene Einflüsse

auf den RNS-Stoffwechsel (Karlson-Theorie), Folge einer Einwirkung auf den DNS-Stoffwechsel sind. Nach Drews und Wacker (1967) findet sich radioaktiv markiertes Testosteron nach 1-stündigem Kontakt mit pseudomonas testosteroni in signifikant höherer Masse an der DNS wieder und nicht an der RNS. Nach 2-3-stündigem Kontakt verschwindet der peak über der DNS wieder.

Da wir uns den Veränderungen der DNS zuwenden, ist markiertes Thymin (als Nukleosid Thymidin) als einzige DNS-spezifische Base besonders geeignet für Einbauversuche. Erst seit kurzer Zeit ist eine Mitochondrien-DNS bekannt, die etwa 1% der Gesamt-DNS ausmacht. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Markierung dieser Mitochondrien-DNS die Ergebnisse bezüglich der Kern-DNS beeinflusst, da bekannt wurde, dass sie besonders intensiv austauscht. So entfallen nach Nass (1967) 12 h nach Hepatektomie 50% des gesamten ^{32}P -Einbaus in die DNS der Leberzellen auf die Mitochondrien-DNS. Wir fanden (diese Arbeit) nach 5-tägiger Testosteronvorbehandlung 3 h nach Injektion von $[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{Thymidin}$ in der Mitochondrienfraktion von Vesikulardrüsen unreifer Ratten nur 1/50 der ^{14}C -Aktivität, die in den Kernen nachgewiesen werden konnte.

Bei der Auswahl eines Steroidhormons schien uns das Testosteron besonders geeignet, 1. weil es als Sexualhormon spezifische Erfolgsorgane hat, 2. weil es einen eindeutigen proteinanabolen Effekt hat, 3. weil es im Gegensatz zu den Östrogenen nicht zyklusabhängig ist und 4. weil die physiologische Dosis der Androgene höher liegt als die der Östrogene und somit für die Analysen der Radioaktivität eine bessere Ausgangsposition besteht.

Zu Beginn unserer Arbeiten über den Einfluss von Testosteron auf den DNS-Stoffwechsel standen wir vor folgender Situation: Kochakian und Harrison (1962) stellten fest, dass Kastrationsfolgen an Vesikulardrüsen von erwachsenen männlichen Mäusen durch Behandlung mit Androgenen behoben werden können. Und zwar steigt nach Androgenapplikation das Organgewicht wieder an; proportional dazu vermehrt sich der Protein- und Aminosäuregehalt der Organe. Verglichen mit dem Organgewicht nimmt die Gesamt-DNS-Menge

langsamer, die Gesamt-RNS-Menge schneller zu.

Kassenaar, Querido und Haak (1962) fanden entsprechende Ergebnisse an Vesikulardrüsen kastrierter männlicher Ratten und Mäuse nach Testosteronapplikation. Sie schreiben: Testosteronbehandlung ruft eine Vermehrung der Gesamtmenge von DNS und RNS hervor, in der Weise, dass die RNS-Konzentration ansteigt, während die DNS-Konzentration fällt.

Beim Vergleich mit anderen Organen, wie Prostata, Musculus levator ani und Niere fanden die gleichen Autoren (Kassenaar, 1962) nach Androgenapplikation Unterschiede im Verhalten der Nukleinsäurekonzentrationen und schliessen daraus, dass die Reaktionen der einzelnen Erfolgsorgane bei Behandlung mit verschiedenen Androgenen nicht gleich sind. Kidson und Kirby (1965) stellten fest, dass die nach Applikation eines Steroidhormons beobachtete Steigerung der RNS-Synthese spezifischen Charakter habe, d.h., es werden bestimmte, für den jeweils auslösenden Stimulus typische Arten von RNS synthetisiert.

Was den Einbau von markierten Vorstufen in Polymere unter Hormoneinfluss betrifft, fanden Butenandt, Günther und Turba (1960) einige Stunden nach Testosterongabe an unreife männliche Ratten einen Anstieg der Aufnahme von ^{14}C -markiertem l-Leucin in die Proteine der Vesikulardrüsen auf das 4-fache. T. Mann (1964) erwähnt eine Arbeit von Fleischmann und Fleischmann, nach der bei kastrierten Ratten wiederholte Gabe von Testosteron den Einbau von ^{32}P in die Vesikulardrüsen-DNS fördern soll. Bei Verabreichung von β -Östradiol mit gleichzeitiger Gabe von Uridin-2- ^{14}C kam es, wie Hamilton (1964) am Rattenuterus beobachtete, gegenüber den nicht mit β -Östradiol behandelten Kontrolltieren zu einem raschen, linearen Anstieg der Radioaktivität in der RNS, der bereits nach 3 h seinen Gipfel erreicht hatte. Nach Testosteronbehandlung fanden wir ein Maximum der Thymidinsammlung in den Vesikulardrüsen 3 h nach Injektion.

Am Rande sei eine Arbeit von Sekeris (1965) mit anderen Steroidhormonen und anderen Versuchstieren erwähnt. Er stellte 4-5 h nach Injektion des Verpuppungshormons Ecdyson in die Insektenlarve von *Calliphora erythrocephala* einen 140proz. An-

stieg des Einbaus von ^{32}P in die RNS der Epidermiszellen fest.

Wir haben bewusst in-vivo-Versuche gewählt, weil der Plan bestand, durch Kombination des Studiums von in-vivo-Bindung des Testosterons mit dem Studium von in-vivo-Wirkungen Anhaltspunkte für die primären physiologischen Wirkorte zu bekommen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass bevorzugte Bindungsorte nicht unbedingt bevorzugte Wirkorte zu sein brauchen.

Bei den bisherigen Untersuchungen über die Wirkung von Hormonen, besonders Steroidhormonen, auf die Nukleinsäuren wurden mehr Mengenstudien getrieben als Bestimmungen der Einbauraten von radioaktiv markierten Vorstufen. Bei der vorliegenden Arbeit wurden soweit wie möglich Mengen- und Einbaustudien miteinander verbunden, da hierdurch eine Fülle von Informationen gegeben ist. Einbaustudien allein können zu Fehlschlüssen führen, da der Einbau einer markierten Vorstufe in ein hochpolymeres Produkt nicht notwendig ein Zeichen für dessen Biosynthese ist (Harbers, 1964).

Nach Schoenheimer, Ratner und Rittenberg (1939) und Niklas und Mitarbeitern (1958) unterliegen vor allem Proteine einem ständigen Auf- und Abbau, auch bei konstanter Menge. Dabei versteht man unter Aufbauraten (Syntheseraten) die Menge Substanz, die pro Zeiteinheit aufgebaut wird. Analog dazu ist die Abbauraten definiert.

Ein Einbau von markierten Vorstufen ist auch dann möglich, wenn Syntheseraten und Abbauraten sich gegenseitig aufheben. Ein verstärkter Einbau einer radioaktiven Vorstufe unter dem Einfluss eines Wirkstoffs kann einfach dadurch zustande kommen, dass Synthese- und Abbauraten um den gleichen Betrag ansteigen; dabei bleibt die Substanzmenge konstant. Es kann vorkommen, dass die Syntheserate zunimmt, jedoch in etwas geringerem Masse als die Abbauraten, so dass trotz Abnahme der Substanzmenge eine Steigerung des Einbaus der radioaktiven Vorstufe resultiert.

Die Feststellung eines verstärkten Einbaus ohne Substanzänderung kann von hohem physiologischen Interesse sein, weil hierbei ein Einfluss auf die biologische Halbwertszeit (turnover-rate, Austauschrate, Umsatzrate) der interessierenden Substanz zum Ausdruck käme. Allerdings müsste bei solchen Befunden ge-

sichert sein, dass die Konzentration der markierten Vorstufe im untersuchten Organ unter dem Einfluss des Wirkstoffs nicht geändert wird (mögliche Korrektur nach Kenntnis dieser Konzentration). Es läuft eine eigene Arbeit über den Einfluss von Testosteron auf die Konzentration an markierten DNS-Bausteinen, um die hier vorgetragenen Befunde eventuell korrigieren zu können.

Es gibt also drei mögliche Ursachen für eine Einbausteigerung, die sich auch überlagern können. Sie seien an den Grenzfällen erläutert.

1. Synthese- und Abbauraten werden um den gleichen Betrag erhöht (erniedrigt). Es resultiert kein Substanzzuwachs. Dieser Befund ist gleichbedeutend mit Erhöhung (Verminderung) einer vorgegebenen Austauschrate.
2. Ein Austausch findet nicht statt (Austauschrate = 0), jedoch wird die Syntheserate erhöht. In diesem Falle wäre die Steigerung der Einbauraten ein unmittelbares Mass für den Substanzzuwachs und Ausdruck einer echten Synthesesteigerung.
3. Austauschrate und/oder Zuwachsraten (Differenz zwischen Synthese- und Abbauraten) bleiben unter dem Einfluss des Wirkstoffs konstant, jedoch wird die Konzentration der markierten Vorstufen im interessierenden Organ erhöht; abzulesen an der erhöhten spezifischen Aktivität der Vorstufe bei konstanter Gesamtkonzentration der Vorstufe. Ein beobachteter verstärkter Einbau der radioaktiven Vorstufe ist nicht Ausdruck einer verstärkten Aktivität der aufbauenden Enzyme.

Es lässt sich also ersehen, wie ausserordentlich vorsichtig Einflüsse auf die Einbauraten interpretiert werden müssen, und wie wichtig es ist, ergänzende Untersuchungen in das Programm aufzunehmen.

Versuchsbedingungen.

Die bisherigen Versuche über den Einfluss von Androgenen auf den Nukleinsäurestoffwechsel in Sexualorganen wurden fast ausschliesslich an kastrierten Tieren vorgenommen. Wir verwendeten bei unseren Versuchen geschlechtsunreife Tiere, um physiologischere Bedingungen zugrunde zu legen. Bei unreifen Tieren beschleunigen die Androgene die natürliche Entwicklung der

Sexualorgane, bei kastrierten Tieren wird die unnatürliche Rückbildung wieder aufgehoben. Die Bedingungen sind auch im Hinblick auf vermiedene Operationsschäden physiologischer.

Den 25 bis 30 Tage alten, 70 ± 5 g schweren Ratten wurden 100 μ g Testosteron injiziert. Durch diese Dosis wurde gerade maximales Wachstum der Vesikulardrüsen erzielt.

Die angegebene Testosteronmenge wurde an fünf aufeinanderfolgenden Tagen appliziert. Etwa nach 5-tägiger Vorbehandlung wird eine maximale Differenz zwischen den Wachstumsgeschwindigkeiten der Vesikulardrüsen behandelter und unbehandelter Tiere erreicht.

Die Probleme des Wirkungsmechanismus von Hormonen sind von biochemischem und medizinischem Interesse. Zur Zeit kennen wir trotz mancher Theorien noch in keinem Fall den tatsächlichen Wirkungsmechanismus. Testosteron dient uns als Beispiel, um zu klären, wie ein Stoff mit so wenigen Molekülen im Verhältnis zur Molekülzahl des Organismus solche eingreifende Effekte hervorruft. Damit hilft die Erforschung des Wirkungsmechanismus eines Hormons, speziell auch bezüglich seiner Wirkung auf den genetischen Apparat, bei der Klärung der grundlegenden Frage, welche Möglichkeiten bestimmte chemische Moleküle, seien es Hormone, Antigene oder Carcinogene, haben, um in kleinsten Mengen grosse Wirkungen zu erzielen.

Experimenteller Teil

A. Methodik

1. Versuchstiere und Injektionen

Als Versuchstiere dienten unreife, männliche Sprague-Dawley-Ratten. Jeweils 17 Tieren wurden vom 25. bis 30. Lebenstag täglich um 18 h 100 µg Testosteron (Schering AG, Berlin) in 0,2 ml Sesamöl subcutan unter die Bauchhaut injiziert. Die Kontrolltiere erhielten reines Sesamöl.

Um einen Verlust an Injektionsflüssigkeit durch den Stichkanal zu vermeiden, wurde die Einstichstelle mit einem Tropfen Uhu-Alleskleber verschlossen.

Am 30. Lebenstag wurden 10 bis 12 Tiere mit übereinstimmendem Gewicht (meist 70 ± 5 g) ausgewählt und 1,66 µC [$2\text{-}^{14}\text{C}$]-Thymin (spezifische Aktivität 35,9 mC/mM) (Hersteller: The Radiochemical Center, Amersham, England) in 0,2 ml Wasser pro 70 g Ratte intraperitoneal injiziert.

2. Aufarbeitung der Tiere

Die Tiere wurden je nach Versuchsanordnung 1h, 3h, 7h, 14h, 20h oder 40h nach der Thymininjektion unter Äthernarkose dekapitiert und sezirt.

Das Frischgewicht der sezirten Organe wurde bestimmt. Dann wurden die Organe je nach Arbeitsplan entweder in 10 proz. Trichloressigsäure oder 0,25 m Rohrzuckerlösung bei -18°C eingefroren und mit einem Gefriermikrotom (Kryotom der Fa. WKF, Brandau) in 10-µ-Schnitte zerlegt. Dabei bedienten wir uns einer im Institut entwickelten Einrichtung, die kontinuierliches Schneiden und Abfangen der Schnitte erlaubt.

3. Zellfraktionierung

Die Zellfraktionierung erfolgte nach der von Allfrey (1959) angegebenen Methode durch Ultrazentrifugation. Im Prinzip beruht sie auf der Trennbarkeit von suspendierten Partikeln unterschiedlicher Grösse, Form, Dichte etc. durch schrittweise Änderung eines Schwerfeldes und der Zentrifugationsdauer.

So werden bei der sogenannten Vier-Schritt-Fraktionierung von Rohrzuckerhomogenaten schwache Felder angewendet, um die Kerne zu sedimentieren. Höhere Geschwindigkeiten lassen die Mitochondrien absitzen, und bei langer Zentrifugationsdauer und sehr hoher Geschwindigkeit erhält man die Mikrosomenfraktion. Die Mikrosomenfraktion ist keine einheitliche Fraktion, sondern sie besteht im wesentlichen aus Membranbruchstücken und Ribosomen.

Die 10 μ dicken Organschnitte wurden mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator in einer Rohrzucker- CaCl_2 -Lösung 4 min lang bei 1000 Upm homogenisiert. Um autolytischen Prozessen vorzubeugen, wurden die Behälter beim Homogenisieren und bei der folgenden Zellfraktionierung im Eisbad gekühlt. Das Homogenat wurde durch eine doppelte Gazeschicht und durch eine einfache Moltonschicht gesaugt, um grobe Teilchen zu entfernen. Die Zellfraktionierung wurde mit der präparativen Ultrazentrifuge (Fa. WKF, Brandau) nach folgendem Arbeitsplan durchgeführt (siehe Abb. 1).

4. Isolierung der Nukleinsäuren

Die Abtrennung der Nukleinsäuren von den Proteinen erfolgte nach Furgeson (1962) und Wool (1963). Die Organschnitte wurden 3 mal mit 2 ml kalter 10 proz. Trichloressigsäure und 4 mal mit kaltem 96 proz. Äthanol gewaschen, indem die Schnitte in der Flüssigkeit aufgerührt und dann 5 min bei 3000 Upm zentrifugiert wurden. Dabei denaturiert das Eiweiss. Der Überstand wurde abgegossen. Die an das Eiweiss gebundenen Nukleinsäuren wurden durch 30 min langes Kochen unter dem Rückflusskühler in 5 ml 10 proz. NaCl-Lösung abgetrennt. Während dieser Extraktion wurde durch tropfenweise Zugabe von 0,1 n NaOH der pH-Wert auf 7,0 gehalten. Eine 0,02 proz. Phenolrot-Lösung diente als Indikator (Farbumschlag nach kirschrot bei pH 7,0). Nach dem Kochen wurden die Proteine 5 min bei 3000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand mit den gelösten Nukleinsäuren wurde in ein bezeichnetes Gefäß abgegossen. Die abzentrifugierten Proteine wurden ein zweites Mal extrahiert.

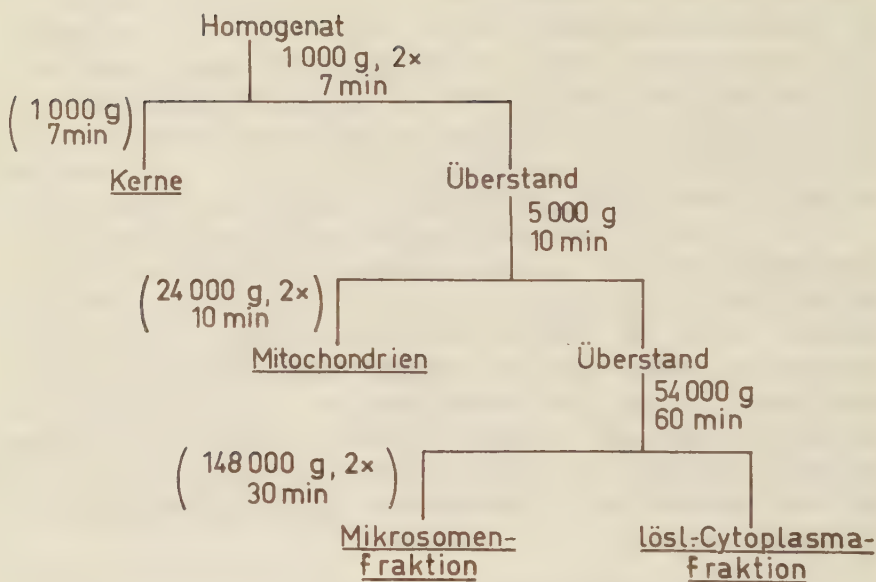


Abb. 1: Arbeitsplan zur Zellfraktionierung. Zentrifugiert wurde in 0,25 M Rohrzucker- 0,0033 M CaCl_2 -Lösung. Daten in Klammern beziehen sich auf das Auswäschen.

Zur Fällung der Nukleinsäuren wurden die Überstände vereinigt und mit der 2,5fachen Menge kalten 96 proz. Äthanol über Nacht bei -10°C stehen gelassen. Die gefällten Na-Nukleate wurden abzentrifugiert, 2 mal mit 2 ml kaltem Äthanol gewaschen, und das Sediment wurde, je nach Grösse der eingesetzten Organgewichte in einer definierten Menge (mindestens 3,0 ml) 0,1 N NaOH gelöst.

0,5 ml der Nukleinsäurelösung wurden zur Radioaktivitätsbestimmung benutzt. Weitere 0,5 ml wurden mit 2,5 ml aqua dest. verdünnt und die Nukleinsäuremenge nach Hoagland et al. (1958) durch Messung der Absorption bei 260 m μ am Spektralfotometer bestimmt. Die Resultate wurden in Zpm/opt. Dichte angegeben.

Nach Schmidt und Tannhauser (1945) werden die Nukleinsäuren durch Alkali voneinander getrennt. Hierzu wurden die restlichen 2,0 ml der alkalischen Nukleinsäurelösung 24 h bei 37°C inkubiert; dabei wird die RNS hydrolytisch gespalten.

Zur Säurepräzipitation der DNS wurde das Gut mit 0,1 Volumen 2 n HCl versetzt. Nach 5 min Zentrifugation bei 3000 Upm enthielt das Sediment die DNS. Im Überstand war die RNS in 0,2 ml HCl gelöst.

Das Sediment wurde mit 1 ml 0,2 n HCl gewaschen und in einer definierten Menge (mindestens 2,0 ml) 0,1 n NaOH gelöst. Davon wurde 1 ml verwendet für die Bestimmung der DNS mit Diphenylamin nach Dische (1955), modifiziert von Burton (1956). Der Rest diente zur Radioaktivitätsbestimmung.

Aus 1,0 ml des Überstandes wurde die RNS-Menge mit Orcin nach Mejbaum (1939) gemäss der Vorschrift von Ogur und Rosen (1950) bestimmt. Der Rest diente zur Radioaktivitätsbestimmung.

Da wir radioaktives Thymidin injiziert hatten, das fast ausschliesslich in die DNS eingebaut wird, war die Aktivitätsbestimmung der RNS-Fraktion eine Kontrolle für die Güte der Nukleinsäuretrennung.

5. Bestimmung der RNS-Menge

Nach Bial (1903) zeigen Pentosen mit konz. HCl, Fe^{+++} -Ionen und Orcin eine Grünfärbung (Bial-Reaktion). Diese Farbreaktion macht man sich bei der RNS-Bestimmung nach Mejbaum (1939), verbessert von Ogur und Rosen (1950), zunutze.

Durch saure Hydrolyse werden aus der RNS die Pentosen freigesetzt, die in starken Säuren zu Furfurol dehydratisiert werden. Je ein Furfurolmolekül reagiert unter Wasserabspaltung mit zwei Orcinmolekülen zu einem Triarylmethan-Farbstoff, der mit Fe^{+++} -Ionen einen grünen Komplex liefert. Die Farbintensität ist proportional der RNS-Menge.

Es wurde eine 0,0033 proz. FeCl_3 (wasserfrei)-Lösung in 12 n HCl hergestellt. Vor Beginn der Messung wurde je 1,0 ml dieser Lösung 10 mg Orcin beigegeben.

Zur Analyse wurde 1,0 ml der Untersuchungslösung mit 1,0 ml des Reagenzgemisches 45 min unter dem Rückflusskühler im siedenden Wasserbad erhitzt. Vor Beginn der fotometrischen Messung wurden die Proben auf 4,0 ml mit aqua dest. aufgefüllt. Dann wurde bei 660 m μ die Extinktion im Vergleich zu einem Leerwert gemessen. Die entsprechenden RNS-Mengen konnten an einer Eichkurve abgelesen werden (siehe Abb. 2).

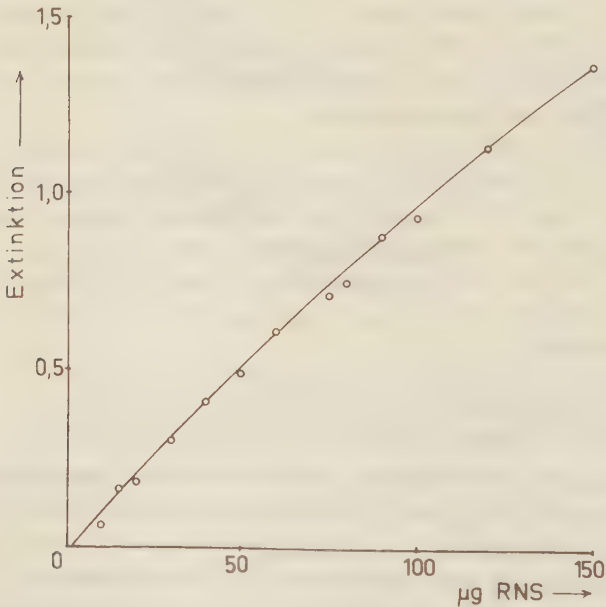


Abb. 2: Orcin-Eichkurve mit RNS-Mengen zwischen 10 und 150 μ g RNS purum der Fluka AG Chem. Fabrik, Buchs, Schweiz.

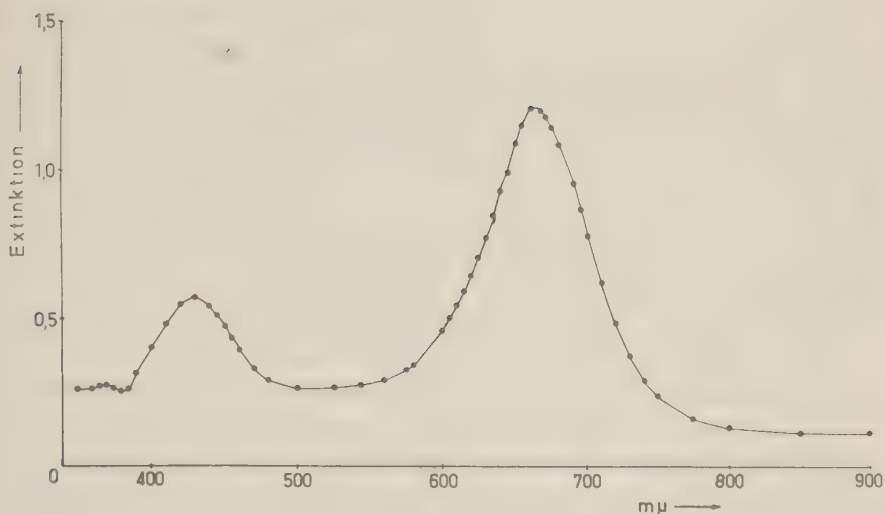


Abb. 3: Absorptionsspektrum einer Orcin-Reaktion mit Vesikular-drüsen-RNS; Absorptionsmaximum bei 665 mμ.

6. Bestimmung der DNS-Menge

Die DNS-Bestimmung erfolgte nach der von Dische (1955) angegebenen und von Burton (1956) verbesserten Methode. Die Farb-reaktion der DNS beruht, ebenso wie die der RNS, auf ihrem Zuckerbestandteil, in diesem der 2-Desoxi-pentose bzw. ihren Metaboliten. Die Natur der bei der Diphenylamin-Reaktion entstehenden farbigen Verbindung ist allerdings unbekannt.

Das Reagenzgemisch wurde aus 300 mg Diphenylamin, 20 ml Eisessig und 0,1 ml konz. H_2SO_4 bereitet. Hinzu kamen 0,1 ml einer Acetaldehydlösung, die unmittelbar vor Gebrauch aus konz. Acetaldehydlösung 1:50 verdünnt wurde. 1,0 ml der Untersuchungslösung wurde mit 2,0 ml Reagenzgemisch 17 h bei 30°C inkubiert. Es entstand eine blaugefärbte Flüssigkeit, deren Extinktion am Spektralfotometer bei 595 mμ im Vergleich zu einem Leerwert gemessen wurde. An einer Eichkurve (Abb. 4) konnten die entsprechenden DNS-Mengen abgelesen werden.

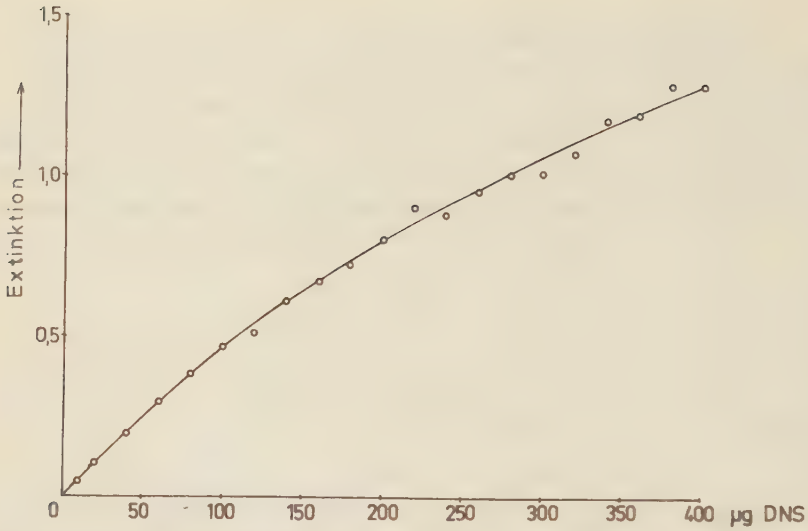


Abb. 4: Eichkurve als Ergebnis der Diphenylamin-Reaktion mit DNS-Mengen zwischen 10 und 400 µg DNS niedermolekular aus Hering MG: 1253,86 n der Fluka AG, Buchs, Schweiz.

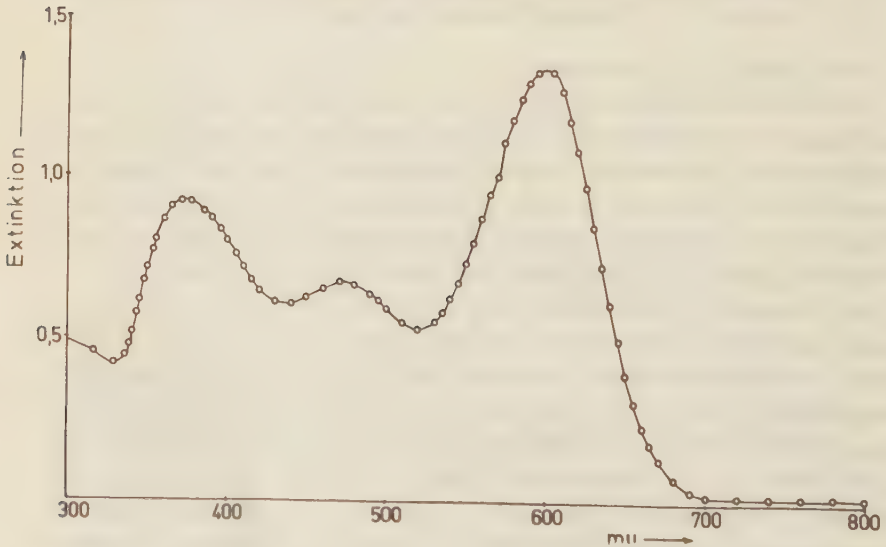


Abb. 5: Spektrogramm einer Diphenylamin-Reaktion mit Vesikular-drüsen-DNS; Absorptionsmaximum bei 600 mµ.

7. Radioaktivitätsbestimmungen

a) Flüssig-Szintillator-Technik (FST)

In einigen Fällen wurden die radioaktiven, meist wässrigen Lösungen im Flüssig-Szintillations-Spektrometer (TRI-CARB Liquid-Scintillation-Counter Model 314 E, Fa. Packard, La Grange, Illinois, USA) ausgemessen. Auf das Prinzip wird im folgenden Absatz eingegangen.

Trifft ein radioaktives Teilchen oder eine radioaktive Strahlung auf ein zur Fluoreszenz befähigtes Molekül, dann wird ein winziger Lichtblitz emittiert. Die Möglichkeit, solche Lichtblitze zu zählen, dient als Grundlage der FST. Das von der fluoreszierenden organischen Substanz emittierte Licht wird von Sekundärelektronenvervielfachern (Multipliern) aufgenommen und führt an diesen Multipliern zu Spannungsabfällen, die, soweit sie in einem gewissen einstellbaren Grössenbereich liegen, in einheitlicher Form registriert werden. Die Zählrate entspricht der Zahl der von den Multipliern erfassten Zerfälle in der Probe, unter der Voraussetzung, dass die Energie der auftreffenden β -Teilchen dem im Gerät eingestellten Energiebereich angehört.

Bei der angewendeten Methode ist die fluoreszierende organische Substanz ein Derivat des Diphenylbenzols. Die Szintillator-Lösung enthält 600 ml einer Lösung von 4 g PPO und 0,15 g POPOP in 1 l Toluol mit 400 ml abs. Äthanol. PPO = 2,5-Diphenyloxazol; POPOP = p-bis-2-(5-phenyloxazolyl)-1-benzol. Der Äthanolzusatz ist erforderlich, damit im begrenzten Umfang wässrige radioaktive Lösungen verwendet werden können.

Eine gewisse Strahlungsintensität ist infolge von Höhen- und Umgebungsstrahlung, aber auch in Form von thermischen Elektronen im Multiplier, immer vorhanden, so dass das Zählgerät auch bei Abwesenheit von radioaktiver Substanz anzeigt. Zur Bestimmung der Grösse dieses Untergrunds (backgrounds) wurden jeweils 10 ml des reinen Szintillatorgemischs im TRI-CARB gemessen. Die Werte für den background, die bei jeder Messreihe mitbestimmt wurden, lagen von Mai 1964 bis April 1965 zwischen 80

und 110 Ipm (Impulse pro Minute).

Das Szintillationsgemisch wurde zur Beschickung des TRI-CARB in Probe I und II zu je 10 ml aufgeteilt. Zu Probe I wurde 1,0 ml einer Lösung von radioaktiver Benzoesäure in Toluol gegeben, die eine Radioaktivität von genau 100 Zpm (Zerfälle pro Minute) aufweist. Zu Probe II wurde 1,0 ml Toluol gegeben. Die Differenz der Impulse von Probe I und II ergibt die Ausbeute des TRI-CARB in Prozent. Mit Hilfe dieses regelmässig zugesetzten internen Standards wurde die tatsächliche Radioaktivität nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Ipm der Probe} - \text{Ipm des backgrounds} \times 100}{\text{Ausbeute in \%}} = \text{Zpm}$$

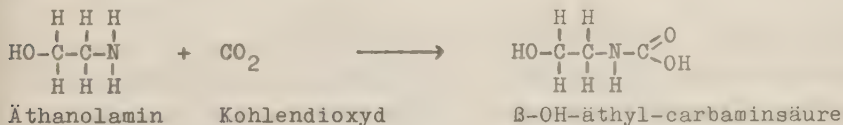
b) Schöniger-Verbrennung in Verbindung mit der Flüssig-Szintillator-Technik

Die Radioaktivitätsbestimmung nach Schöniger (1955), modifiziert von Kelly und Mitarbeitern (1961), beruht auf der Verbrennung getrockneter ^{14}C -enthaltender Analysensubstanz zu CO_2 und $^{14}\text{CO}_2$. Das entstandene $^{14}\text{CO}_2$ wird durch Äthanolamin, das dem Szintillatormischung zugesetzt wird, gebunden und der Flüssig-Szintillator-Technik zugeführt.

Das Schöniger-Gefäss, in dem die Analysensubstanz verbrannt wird, besteht aus einem 500-ml-Erlenmeyerkolben mit durch Schliffhahn verschliessbarem Ansaugrohr und einem Glasschliffstopfen, an den ein Platinnetz angeschmolzen ist.

Die über P_2O_5 im Vakuumexsikator bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Organe wurden in Filterpapierschiffchen in das Platinnetz eingeklemmt. Bei der Radioaktivitätsbestimmung der Nukleinsäurelösungen wurden bestimmte Mengen (meist 200 λ) mit einer Mikropipette auf das Filterpapier aufgetragen und unter leichtem N_2 -Strom getrocknet. An das Filterpapier wurde eine kleine Lunte angeschnitten, damit beim Anzünden nicht schon ein Teil der Analysensubstanz ausserhalb des Schönigergefässes verbrannte; ausserdem wurde das Papier möglichst klein gehalten, um nicht unnötig viel CO_2 und H_2O entstehen zu lassen. Das Schöni-

ger-Gefäß wurde 3 min im Dewargefäß mit Kohlensäureeis vorgekühlt, damit die Verbrennungswärme an das Glas abgegeben werden konnte und so die Ausdehnung der Verbrennungsgase in Grenzen gehalten wurde. In das vorgekühlte Gefäß wurde 3 sec lang ein kräftiger O_2 -Strom geleitet, um eine vollständige Verbrennung in O_2 -Atmosphäre zu gewährleisten. Unmittelbar darauf wurde das im Platinnetz eingeklemmte Filterpapier an seiner Lunte angezündet; im gasdicht verschlossenen Gefäß sah man die Analysensubstanz mit heller Flamme abbrennen. Dann wurde das Gefäß 15 min wie beschrieben gekühlt, damit das Szintillator-Gemisch, das nunmehr zugegeben wurde, durch den entstandenen Unterdruck ohne Verlust an $^{14}CO_2$ aus dem Scheidetrichter in das Schöniger-Gefäß gesaugt werden konnte. Das Szintillatorgemisch, von dem 25 ml eingesetzt wurden, bestand diesmal aus 9 Teilen des Seite 21 angegebenen Gemischs und 1 Teil Äthanolamin (stets frisch bereitet). Die Gefäße wurden über Nacht geschüttelt, damit das Äthanolamin das entstandene $^{14}CO_2$ gemäss nachstehender Formel vollständig binden konnte.



Frühestens nach 12 h wurden von den 25 ml des Szintillator-Gemischs je eine Probe zu 10 ml der Flüssig-Szintillator-Technik zugeführt.

Die Radioaktivitätsbestimmung nach Schöniger erbrachte bei Verbrennung von steigenden Mengen ^{14}C -haltiger Folie (3790 Zpm/mg) eine mittlere Ausbeute von 84,3 % (siehe Tab. 1).

c) Bestimmung der Radioaktivität in Gasphase

Zur Radioaktivitätsbestimmung nach Simon (1959) wurden die völlig trockenen Zellfraktionen auf der Mikrowaage eingewogen, zusammen mit 50 mg CuO und 80 mg $KClO_4$ in einen Quarzglaszylinder gegeben, unter Vakuum verschlossen und bei $640^\circ C$ verbrannt. Nachdem die Zellfraktionen oxidativ völlig vergast waren, wurde das Bombenrohr mit dem Gas der Probe in die Apparatur von Simon

Tab. 1: Ausbeute der Schöniger-Methode bei Verbrennung von ^{14}C -Folie mit einer Radioaktivität von 3790 Zpm/mg.

^{14}C -Folie (3790 Zpm/mg) in mg	nach Schöniger- Verbrennung gemessene Zpm	Zpm/mg	Ausbeute in %
1,841	5620	3050	80,5
2,575	8000	3100	82,0
2,654	8560	3220	85,0
2,893	9340	3230	85,5
2,850	11900	3090	81,7
4,642	14460	3120	82,2
4,739	15370	3245	85,6
4,830	15450	3200	84,4
16,879	55500	3290	86,8
18,688	60400	3230	85,4
23,038	77500	3360	88,6

gegeben und dort unter Vakuum zertrümmert. Das sich nun expandierende Gas wurde so geleitet, dass H_2O durch eine Kühlfalle bei -170°C (flüssiger Stickstoff) ausgefroren wurde. Weitere bei der Verbrennung entstehende Gase (N-Verbindungen), die bei diesen Temperaturen noch nicht einfrieren und keinen Kohlenstoff enthalten, wurden abgesaugt. Das CO_2 , das ja die Aktivität des in der Zellfraktion enthaltenen Thymidins enthielt, wurde nun -nachdem in der Apparatur wieder Vakuum herrschte - in Gasphase überführt, sein Volumen an einem Manometer bestimmt und unter Methanüberdruck in ein Gasfüllzählrohr (Bertold/Wilddbad) überführt, in dem anschliessend die Impulse bei 3600 Volt Hochspannung und einem Gasdruck von einer Atmosphäre ausgezählt wurden.

B. Ergebnisse

1. Einfluss von Testosteron auf den Wassergehalt der Vesikular- drüsen

Rudolph und Samuels (1949) beobachteten, dass Testosteron schon nach einmaliger Injektion in kastrierte Ratten den Wassergehalt der Vesikulardrüsen erhöht. Bei unseren Versuchen an unreifen Ratten zeigte sich nach fünftägiger Testosteronbehandlung kein signifikanter Effekt (0 bis +3 %). Das Verhältnis von Frischgewicht zu Trockengewicht der Vesikulardrüsen Testosteron-behandelter und unbehandelter Tiere betrug im Mittel 5,4 : 1 (siehe Tab. 2).

Tab. 2: Einfluss von Testosteron auf den Wassergehalt von Vesikulardrüsen unreifer Sprague-Dawley-Ratten (30 Tage). Vom 25. bis 29. Lebenstag wurden täglich 100 µg Testosteron in 0,2 ml Sesamöl subcutan injiziert (Kontrolltiere reines Sesamöl). Trocknung der Drüsen erfolgte im Vakuumexsikator über P_{205} bis zur Gewichtskonstanz.

	Kontroll- tiere	Testosteron- beh. Tiere	Effekt in %
Zahl der Tiere	8	7	
Frishgew. (mg)	16,13 $\pm$ 0,83	34,49 $\pm$ 2,55	+ 115
Trockengew. (mg)	2,97 $\pm$ 0,19	6,36 $\pm$ 0,45	+ 114
<u>Frishgewicht</u>			
<u>Trockengewicht</u>	5,41 $\pm$ 0,04	5,42 $\pm$ 0,07	+ 0,19

Der Gewichtsanstieg der Vesikulardrüsen nach 5-tägiger Testosteronbehandlung ist im wesentlichen Folge einer Vermehrung der Proteine, die etwa 4/5 des Trockengewichts eines Organs ausmachen.

2. Einfluss von Testosteron auf den DNS- und RNS-Gehalt der Vesikulardrüsen

Wir beobachteten bei unreifen Ratten den gleichen Einfluss des Testosterons auf die DNS- und RNS-Menge wie Kochakian und Harrison (1962) bei kastrierten Tieren. Wie Tab. 3 zeigt, nimmt das Gewicht der Vesikulardrüsen nach 5-tägiger Testosteronbehandlung um etwa 150 %, die RNS-Menge um etwa 350 % und die DNS-Menge um etwa 80 % zu. Das bedeutet, dass die relative Menge ($\mu\text{g}/\text{mg}$ Drüse), d.i. die Konzentration an RNS, ansteigt, wohingegen für die DNS ein Abfall zu verzeichnen ist.

Tab. 3: Einfluss von Testosteron auf Mengen und Konzentrationen von RNS und DNS in Vesikulardrüsen unreifer Sprague-Dawley-Ratten (30 Tage alt). Bedingungen wie Tab. 2.

	Kontroll- tiere	Testosteron- beh. Tiere	Effekt in %	
Zahl der Tiere	8	9		
Körpergewicht (g)	55 $\pm 1,3$	57 $\pm 0,4$	+	4
Drüsen-Frisch- gewicht (mg)	9,13 $\pm 0,74$	22,59 $\pm 1,24$	+	148
RNS-Menge absolut ($\mu\text{g}/\text{Drüse}$)	23,0 $\pm 4,0$	103,0 $\pm 9,3$	+	348
RNS-Menge relativ ($\mu\text{g}/\text{mg}$ Frischgew.)	2,57 $\pm 0,49$	4,70 $\pm 0,7$	+	83
DNS-Menge absolut ($\mu\text{g}/\text{Drüse}$)	95,0 $\pm 0,4$	172,0 $\pm 9,3$	+	81
DNS-Menge relativ ($\mu\text{g}/\text{mg}$ Frischgew.)	10,50 $\pm 0,39$	7,64 $\pm 0,24$	-	28

Auch diese Versuche sprechen dafür, dass die Wirkung des Testosterons mit einer Hypertrophie beginnt. Diese Hypertrophie ist aber kaum auf vermehrte Wasseraufnahme, sondern vielmehr auf Anstieg des Proteingehalts der Zellen zurückzuführen.

3. Einfluss von Testosteron auf den zeitlichen Verlauf der Aufnahme von $[2-^{14}\text{C}]$ Thymidin in die Vesikulardrüsen.

Eine weitere Möglichkeit, die Beteiligung des Kernstoffwechsels an der ersten Wirkung von Androgenen in Zellen akzessorischer Sexualorgane zu klären, ist das Studium der Aufnahme von ^{14}C -Aktivität in die Vesikulardrüsen nach Gabe von $[2-^{14}\text{C}]$ Thymidin (siehe Abb. 6).

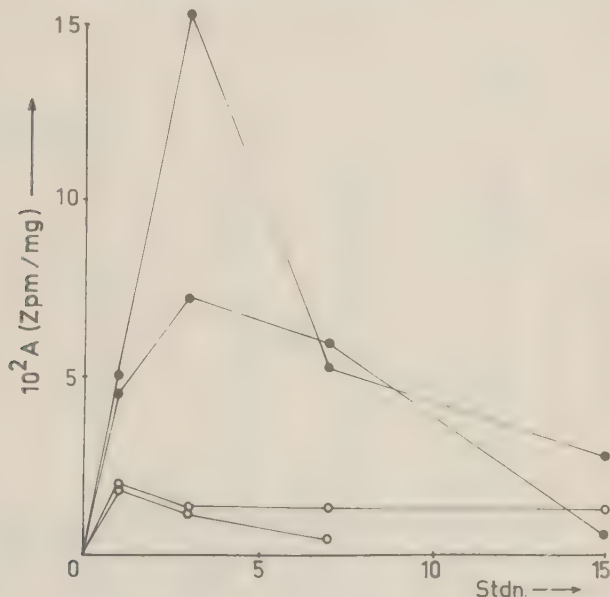


Abb. 6: Einfluss von Testosteron auf den zeitlichen Verlauf der Aufnahme von $[2-^{14}\text{C}]$ Thymidin in die Vesikulardrüsen unreifer Sprague-Dawley-Ratten (30 Tage). Vom 25. bis 29. Lebenstag wurden täglich 100 μg Testosteron in 0,2 ml Sesamöl subcutan injiziert (Kontrollenreines Sesamöl); am 30. Tag wurden jedem Tier 1,66 μC $[2-^{14}\text{C}]$ Thymidin pro 70 g Ratte i.p. injiziert.
 o : Kontrollen; • : Testosteron-behandelte Tiere.
 Abszisse: Zeit nach $[2-^{14}\text{C}]$ Thymidininjektion
 Ordinate: ^{14}C -Aktivität A in Zpm/mg Gewebe

Da bei dieser Versuchsanordnung jeweils die ^{14}C -Aktivität des ganzen Organs bestimmt wurde, beruht der beobachtete Effekt nicht nur auf unterschiedlichem Einbau von $[2-^{14}\text{C}]$ Thymidin in die DNS, sondern eventuell auch auf unterschiedlicher Ansammlung dieses DNS-Bausteins und seiner Metabolite ausserhalb der Nukleinsäuren.

4. Untersuchungen über den zeitlichen Beginn des Einflusses von Testosteron auf die Aufnahme von $[2-^{14}\text{C}]$ Thymidin in die Vesikulardrüsen und einige andere Rattenorgane

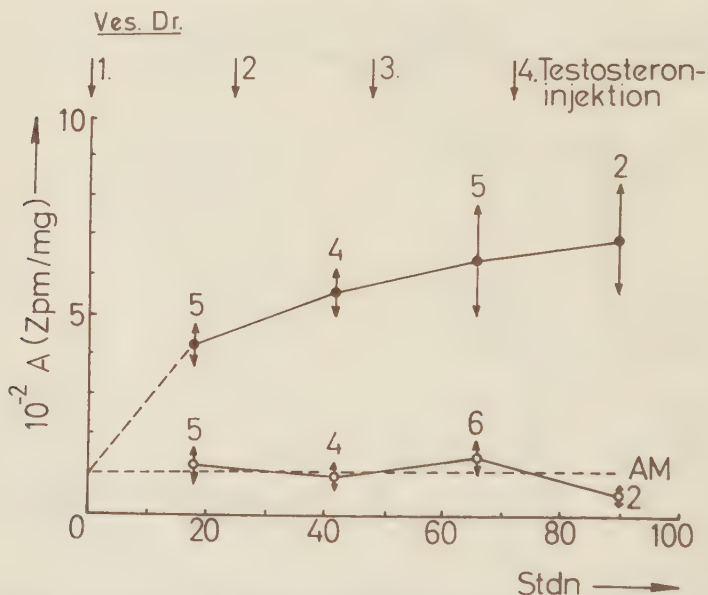


Abb. 7: Abhängigkeit des Einflusses von Testosteron auf die Aufnahme von $[2-^{14}\text{C}]$ Thymidin in die Vesikulardrüsen unreifer Sprague-Dawley-Ratten von der Dauer der Vorbehandlung. Vom 25. bis 29. Lebenstag wurden täglich 100 μg Testosteron in 0,2 ml Sesamöl subcutan injiziert (Kontrollen reines Sesamöl). Die Ratten wurden zu den angegebenen Zeitpunkten jeweils 3 h nach Thymidininjektion (1,66 μC pro 70 g Ratte) getötet.
 o : Kontrollen; • : Testosteron-behandelte Tiere;
 - - - : Arithmetische Mittelwerte (AM) bzw. Extrapolation
 Abszisse: Zeit nach Beginn der Testosteronbehandlung
 Ordinate: ^{14}C -Aktivität A in Zpm/mg Gewebe
 Die Zahlen an den Kurven = Anzahl der Versuchstiere.

Fünftägige Testosteronbehandlung erhöht die Aufnahme von $[2-^{14}\text{C}]$ -Thymidin in die Vesikulardrüsen durchschnittlich um 500 %. Wie Abb. 7 zeigt, kann der Effekt im Einzelfall sehr viel grösser sein.

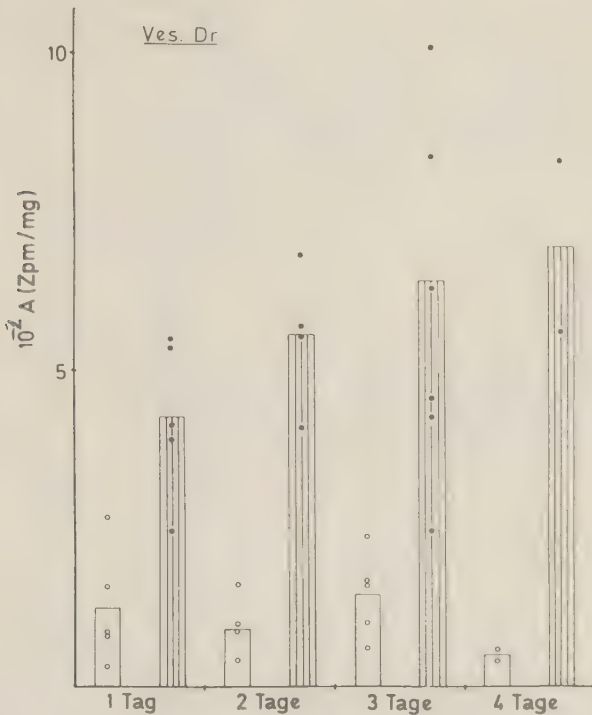


Abb. 8, 9, 10, 11 und 12 zeigen den Einfluss von Testosteron auf die Aufnahme von $[2-^{14}\text{C}]$ Thymidin in einige Rattenorgane in Abhängigkeit von der Dauer der Vorbehandlung. Bedingungen wie Abb. 7. Weisse Säulen: Kontrolltiere; gestreifte Säulen: Testosteron-behandelte Tiere; Höhe der Säulen: Arithmetisches Mittel der Einzelergebnisse.
 o : Einzelergebnisse ohne Testosteronvorbehandlung
 • : Einzelergebnisse nach Testosteronvorbehandlung
 Abszisse: Zeit der Testosteronbehandlung in Tagen
 Ordinate: ^{14}C -Aktivität A in Zpm/mg Gewebe

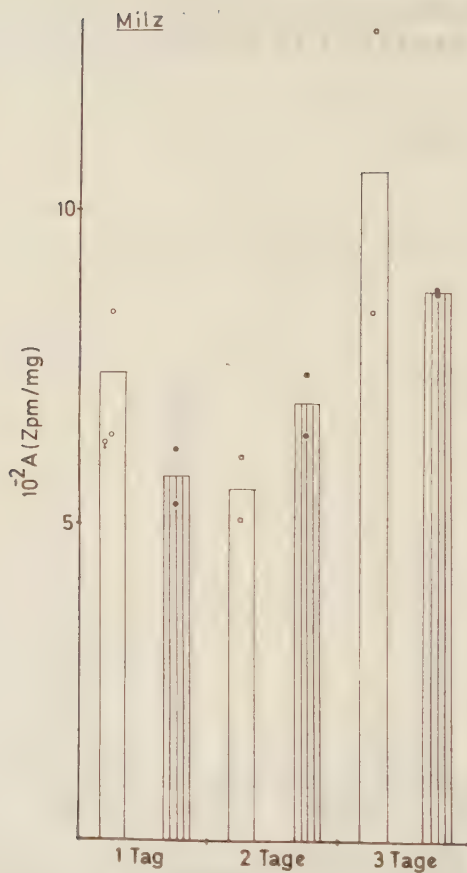


Abb. 9.

Abb. 8 zeigt die der Abb. 7 zugrunde liegenden Einzelergebnisse für Vesikulardrüsen. Die breite Streuung der Einzelergebnisse ist – ebenso wie die breite Streuung der Werte aus Abb. 6 – keinesfalls in der Methodik zu suchen. Den Beweis dafür liefert die Abb. 12, wo für die Leber bei gleicher Versuchsanordnung und in der gleichen Messreihe ganz eng beieinanderliegende Aktivitäten zu verzeichnen sind. Vielmehr liegt der Schluss nahe, dass bei den 30 Tage alten Tieren, die ja kurz vor der Geschlechtsreife stehen, die Ansprechbarkeit des Erfolgsorgans

Abb. 10.

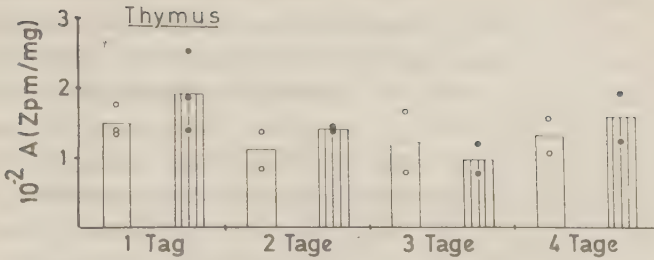


Abb. 11.

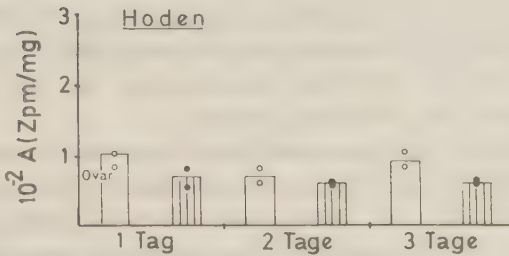
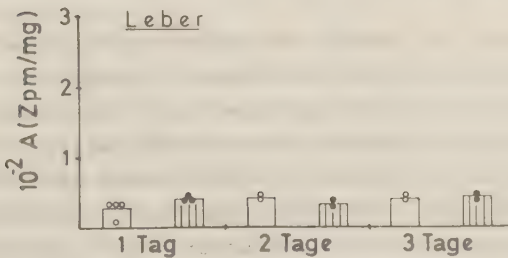


Abb. 12.



Vesikulardrüse auf das Androgen stark differiert. So könnte man die unterschiedliche Aufnahme radioaktiven Thymidins nach Testosteronapplikation auf die unterschiedlich weit fortgeschrittene Geschlechtsreife der jungen Ratten zurückführen und von einem unterschiedlichen "Geschlechtsalter" der an Lebenstagen gleichaltrigen Tiere sprechen.

Der Abb. 9 ist zu entnehmen, dass 3 h nach [2- ^{14}C] Thymidininjektion eine erstaunlich hohe ^{14}C -Aktivität pro mg Milzgewebe nachzuweisen ist, unabhängig von der Dauer der Testosteronbehandlung und unabhängig davon, ob überhaupt Testosteron appliziert wurde. Die Aktivitätsmenge in der Milz Testosteron-behandelter und unbehandelter Ratten entspricht etwa der, die die Vesikular-drüsen nach 4-tägiger Testosteronapplikation aufweisen und liegen im Mittel etwa 20 mal höher als die der Leber, 10 mal höher als die des Hodens und 5 mal höher als die des Thymus.

Ebenso wie Abb. 9 (Milz) zeigen auch die Abb. 10 (Thymus), 11 (Hoden) und 12 (Leber) keinen signifikanten Einfluss von Testosteron oder der Dauer der Testosteronbehandlung auf die Aufnahme von radioaktivem Thymidin in diese Organe.

Wenn man als Maßstab die unter den untersuchten Organen geringste und einheitlichste Aktivitätsansammlung in der Leber verwendet, so weist im Mittel Hodengewebe eine 2-fache, Thymusgewebe eine 4-fache und Milzgewebe eine 20-fache Aktivitätsmenge auf.

Eine Deutung dieses so erhebliche Unterschiede aufweisen-den Verteilungsmusters für die DNS-Vorstufe Thymidin 3 h nach ihrer Injektion setzt die Klärung vieler noch unbekannter Faktoren voraus, dass die Ergebnisse vorerst nur aufgezeigt seien.

Der in Abb. 8 (Vesikulardrüsen) so eindeutige Unterschied der Thymidinansammlung in Vesikulardrüsen Testosteron-behandelter und unbehandelter Ratten ist bei den anderen untersuchten Organen (Abb. 9 Milz, Abb. 10 Thymus, Abb. 11 Hoden, Abb. 12 Leber) viel geringer und vor allem uneinheitlich. So lässt sich für die Milz nach einem Tag bei den Kontrollen, nach zwei Tagen bei den Testosteron-behandelten und nach drei Tagen wieder in den Kontrollen mehr Aktivität nachweisen.

Diese Unabhängigkeit der Thymidinaufnahme von der Testosteronbehandlung ist Anhalt dafür, dass der in Abb. 9 abzulesende Anstieg und in Abb. 10 der Abfall der Thymidinaufnahme unter der Behandlung nicht als solcher gewertet werden darf; zudem sind die Werte durch zwei Versuche nur unzureichend gesichert.

5. Untersuchungen über die Lokalisation der gesteigerten $[2-^{14}\text{C}]$ -Thymidin-Aufnahme in den Vesikulardrüsen.

Tab. 4 lässt erkennen, dass Testosteron den Einbau von $[2-^{14}\text{C}]$ Thymidin in die Zellkerne fördert.

Tab. 4: Einfluss von Testosteron auf den Einbau von $[2-^{14}\text{C}]$ Thymidin in die Zellfraktionen von Vesikulardrüsen unreifer Sprague-Dawley-Ratten (30 Tage alt). Vom 25. bis 29. Lebenstag wurden täglich 100 µg Testosteron in Sesamöl subcutan injiziert (Kontrollen reines Sesamöl); am 30. Lebenstag wurde jedem Tier 1,66 µC $[2-^{14}\text{C}]$ Thymidin pro 70 g Ratte i.p. injiziert; Tötung 3 h nach Thymidininjektion; 12 Tiere. Zahlenangaben in Zpm/mg Trockensubstanz (Rohprotein); bei der löslichen Zytoplasmafraktion wurde auf mg Protein (Farbreaktion) bezogen.

	ohne Testosteron	mit Testosteron
Kerne	164	575
Mitochondrien	-	9
Mikrosomen-Fraktion	0	0
lösli. Zytoplasma-Fr.	38	109

Die Kerne behandelte Tiere besitzen etwa dreimal so viel Aktivität wie die Kerne der Kontrolltiere. In den Mitochondrien und in der Mikrosomenfraktion lässt sich praktisch keine Aktivität nachweisen; dagegen enthalten die löslichen Zytoplasma-Frak-tionen beider Versuchsreihen ^{14}C -Aktivität, vermutlich in Form von Thymidin oder dessen niedermolekularen Abbauprodukten.

Wie Tab. 5 zeigt, lassen sich ferner die Aktivitäten und Aktivitätssteigerungen der DNS selbst zuordnen.

Bezieht man die Aktivitäten auf µg DNS, so betragen die Aktivierungen ebenfalls etwa 250 %. Der in der RNS auftretende relative Aktivitätsanteil (1 - 2 Zpm/µg) wird durch Testosteron-behandlung kaum beeinflusst (siehe auch Abb. 13 b II).

Tab. 5: Einfluss von Testosteron auf den Einbau von $[2-^{14}\text{C}]$ Thymidin in die DNS der Vesikulardrüsen unreifer Sprague-Dawley-Ratten (30 Tage alt). Vom 25. bis 29. Lebenstag wurden täglich 100 μg Testosteron in 0,2 ml Sesamöl subcutan injiziert (Kontrollen reines Sesamöl); am 30. Tag wurden jedem Tier 1,66 μC $[2-^{14}\text{C}]$ Thymidin pro 70 g Ratte i.p. injiziert; Tötung 3 h nach Thymidin-Injektion.

	Zahl der Tiere	Drüsen- Gesamt- Gewicht (mg)	μg DNS	$\frac{\text{Zpm(DNS)}}{\mu\text{g DNS}}$	$\mu\text{g RNS}$	$\frac{\text{Zpm(RNS)}}{\mu\text{g RNS}}$
Kon-	3	53,72	371	2,4	316	1,1
trollen	3	52,23	327	2,0	274	1,1
Testost.-	3	97,78	590	7,6	588	1,0
behandelte Tiere	3	84,62	350	7,6	975	1,8

Die Werte der Tab. 6 für Zpm (DNS)/ μg DNS aus einem anderen Versuch bestätigen die Ergebnisse der Tab. 4.

Tab. 6: Bedingungen wie Tab. 5.

	Zahl	$\frac{\text{Zpm(DNS)}}{\mu\text{g DNS}}$
Kon-	4	1,86
trollen	4	1,68
Testost.-	3	5,75
behandelte	3	5,95
Tiere	3	5,58

6. Untersuchungen über DNS-Austauschreaktionen

Wie im theoretischen Teil ausgeführt wurde, muss damit gerechnet werden, dass Einflüsse auf die Einbaurrate von Vorstufen in Hochpolymere lediglich einen Einfluss auf die biologische Halbwertszeit (Austauschrate, turnover rate) widerspiegeln, ohne dass hiermit eine Änderung der stofflichen Menge verbunden ist.

Austauschreaktionen im Sinne Schoenheimers (1942) sind bei der DNS unwahrscheinlich (Harbers u. Heidelberger, 1959). Tatsächlich konnte bisher nur in einigen Fällen eine ganz geringe Austauschrate an der DNS beobachtet werden, die auf einem Austausch endständiger Nukleotide zurückgeführt werden (Adler et al. 1958).

Bei derartigen Versuchen ist unseres Wissens niemals die Frage berücksichtigt worden, ob bestimmte Hormone Austauschreaktionen der DNS ihrer Erfolgsorgane induzieren können. Daher versuchten wir zu klären, ob die beobachteten Einbaueffekte wenigstens zum Teil Folge von Einflüssen auf die Austauschrate im Stoffwechsel der DNS sind.

Wir bedienten uns hierbei zunächst, wie andere Autoren, der einfachsten Versuchsanordnung, die die Möglichkeit schafft, das Vorliegen von Austauschreaktionen wenigstens qualitativ zu erfassen. Es wird über eine möglichst lange Zeit verfolgt, ob die maximal eingebaute Radioaktivitätsmenge im interessierenden Polymeren eines Organs bleibt, oder allmählich abnimmt. In unserem Falle wurde also studiert, ob die maximale Aktivität, die in die DNS der Vesikulardrüsen aufgenommen wird, über 40 h erhalten bleibt oder abnimmt. Es ist also notwendig, auf der Abszisse die Zeit zu vermerken und auf der Ordinate die Zahl der Zerfälle in der DNS bezogen auf das Gesamtorgan, nicht etwa die Zahl der Zerfälle in der Gewichtseinheit DNS; da bei der mit Sicherheit auftretenden Vergrößerung der Vesikulardrüsen und der damit verbundenen Vermehrung der DNS im Organ eine "Verdünnung" der Aktivität erfolgt.

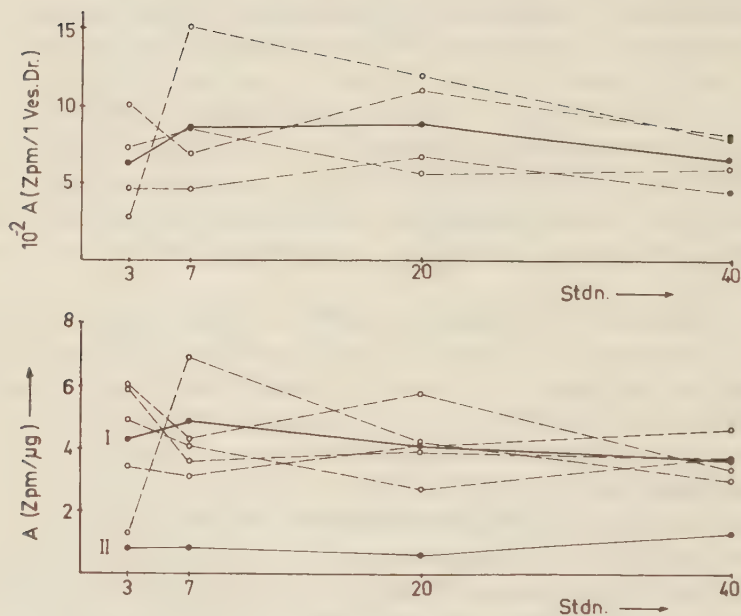


Abb. 13: Zeitlicher Verlauf der spezifischen Aktivität von Vesikulardrüsen-DNS und -RNS nach i.p. Injektion von $[2-^{14}\text{C}]$ -Thymidin in Testosteron-behandelte Tiere. Vom 25. bis 29. Lebenstag wurden täglich 100 μg Testosteron in 0,2 ml Sesamöl subcutan injiziert (Kontrollen reines Sesamöl); am 30. Tag wurden jedem Tier 1,66 μC $[2-^{14}\text{C}]$ Thymidin pro 70 g Ratte i.p. injiziert; Tötung der Tiere 3 bis 40 h nach Thymidininjektion.

Abb. 13 umfasst im Interesse eines Vergleichs zwei Diagramme: a) auf der Ordinate die Zerfälle in der DNS pro Vesikulardrüse,
b) auf der Ordinate die Zerfälle in der DNS pro μg DNS.

I : $\text{Zpm(DNS)}/\mu\text{g DNS}$ II : $\text{Zpm(RNS)}/\mu\text{g RNS}$
— Mittelwerte, - - - Einzelwerde.

Die Abb. 13 a u. b sind sich sehr ähnlich. Offensichtlich fällt ein Verdünnungseffekt kaum ins Gewicht. Auch wird durch

Testosteron kein Austauscheffekt in einem solchen Umfang auslöst, dass er bei unseren Versuchen statistisch gesichert wäre.

7. Einige vergleichende Untersuchungen mit Methenolon

Abb. 14 zeigt, dass Testosteron die Aufnahme von $[2-^{14}\text{C}]$ Thymin in die Leber nicht beeinflusst; im Musculus levator ani ist dagegen anfangs eine geringe Aktivierung festzustellen.

Auch das anabol wirksame Steroid 17 β -hydroxy-1-methyl- Δ^1 -androstenon-(3) (Methenolon der Schering AG, Berlin) fördert die Aufnahme von $[2-^{14}\text{C}]$ Thymidin in die Vesikulardrüsen unreifer Ratten (Abb. 15). Der Effekt ist aber trotz 10facher Dosis nur etwa halb so gross wie nach Testosteronbehandlung. Übrigens betrug bei den Versuchen mit Methenolon die Gewichtszunahme der Vesikulardrüsen etwa 100 % (Vesikulardrüsengewichte der unbehandelten Tiere: $11,7 \pm 1,0$ mg; Vesikulardrüsengewichte der Methenolonbehandelten Tiere: $23,5 \pm 3,9$ mg), also etwas weniger als die Gewichtszunahme bei den Testosteronversuchen. Im Unterschied zu den Testosteronversuchen nehmen aber die Vesikulardrüsen nach Methenolonbehandlung anscheinend vermehrt Wasser auf. Das Verhältnis von Frischgewicht zu Trockengewicht betrug bei behandelten Tieren $5,23 \pm 0,15$ mg und bei unbehandelten $5,23 \pm 0,15$ mg ($p < 0,1$). Dieser Effekt bedarf im Falle des Methenolons weiterer statistischer Sicherung. Der Einfluss von Methenolon auf die Aufnahme von $[2-^{14}\text{C}]$ Thymidin in den Musc. levator ani ist schwer zu beurteilen, da die Messwerte sehr klein sind.

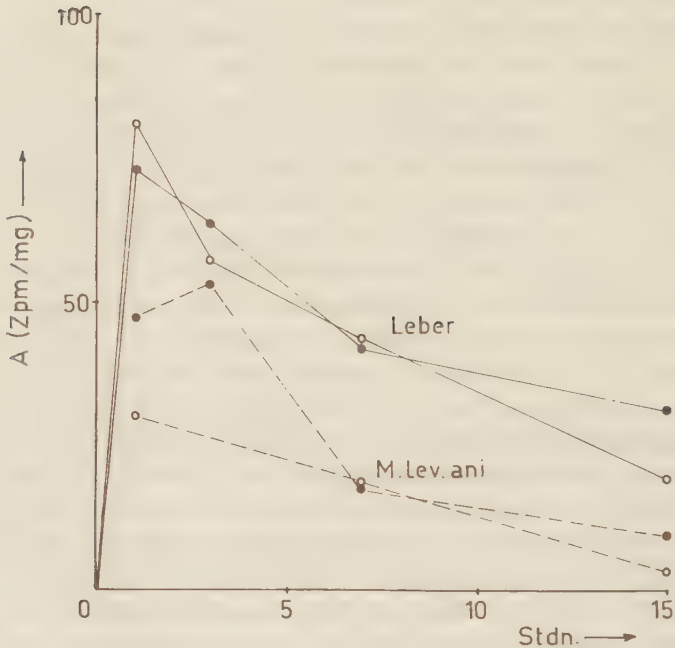


Abb. 14: Einfluss von Testosteron auf den zeitlichen Verlauf der Aufnahme von [2-¹⁴C]Thymidin in Leber und Musculus levator ani unreifer Sprague-Dawley-Ratten (30 Tage alt). Vom 25. bis 29. Lebenstag wurden täglich 100 µg Testosteron in 0,2 ml Sesamöl subcutan injiziert (Kontrollen reines Sesamöl); am 30. Tag wurden jedem Tier 1,66 µC [2-¹⁴C]Thymidin pro 70 g Ratte i.p. injiziert. Abszisse: Zeit nach Thymidininjektion; o : Kontrollen; ● : nach Testosteronbehandlung.

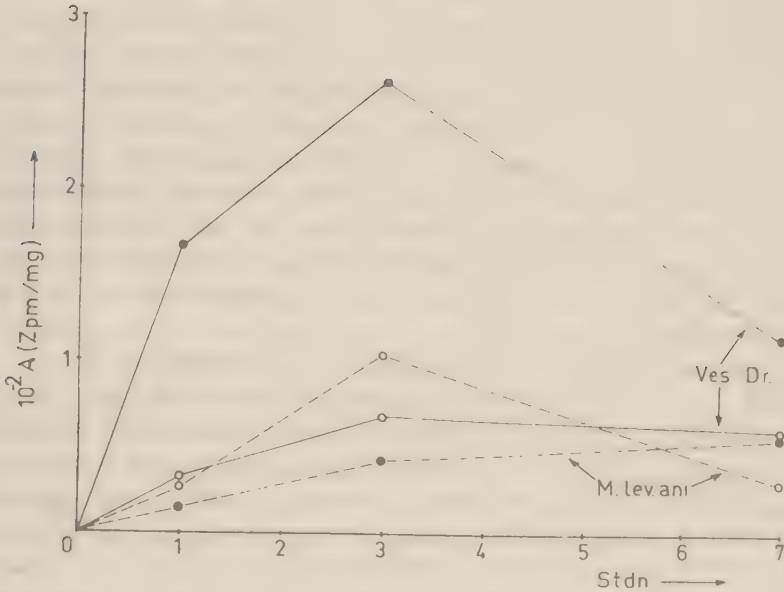


Abb. 15: Einfluss von 17 β -hydroxy-1-methyl- Δ^1 -androstenon-(3) (Methenolon) auf den zeitlichen Verlauf der Aufnahme von [2-14C]Thymin in Vesikulardrüsen und Musculus levator ani unreifer Sprague-Dawley-Ratten (30 Tage alt). Vom 25. bis 30. Lebenstag wurden jedem Tier täglich 1 mg Methenolon in 0,2 ml Sesamöl subcutan injiziert. Abszisse: Zeit nach Thymininjektion; o : Kontrollen; • : Methenolon-behandelte Tiere.

Diskussion

Die nächstliegende Interpretation für den geschilderten Einbaueffekt ist die Förderung der Mitoserate durch Testosteron. Man wird den vermehrten Einbau von $[2-^{14}\text{C}]$ Thymidin in die DNS als Ausdruck unmittelbarer Vergrößerung der DNS-Menge vor und während der Zellteilung ansehen. Befunde an kastrierten Tieren, bei denen erst 31 bis 36 Stunden nach begonnener Testosteronbehandlung Mitosen auftreten (Dirscherl, 1944), lassen jedoch die Möglichkeit offen, dass die hier geschilderten Einbaueffekte noch in keinem unmittelbaren Zusammenhang mit Zellteilungen stehen. Eine Entscheidung wird erst möglich, wenn unsere Arbeiten über den Einfluss von Testosteron auf die Mitoseraten bei unreifen Tieren abgeschlossen sind.

Während nach Testosteronbehandlung die Aufnahme von ^{14}C -Aktivität in die Vesikulardrüsen über ein Maximum läuft (Abb. 6) und drei Stunden nach $[2-^{14}\text{C}]$ Thymidininjektion etwa 500 % höher liegt als in den Kontrollen, bleibt der Einbau dieses Nukleosids in die DNS von 3 bis mindestens 40 Stunden konstant; der beobachtete minimale Aktivitätsabfall liegt durchaus im Rahmen der unvermeidlichen biologischen Schwankungsbreite (Abb. 13). Auch beträgt der Einbaueffekt hier nur etwa 200 bis 300 %. Bemerkenswert ist hierbei, dass die Gesamt- ^{14}C -Aktivität pro Vesikulardrüse bei unbehandelten Tieren etwa die gleiche Grösse besitzt wie die ^{14}C -Aktivität, die sich pro Vesikulardrüse in der DNS und RNS wiederfinden lässt. Bei den Testosteron-behandelten Tieren dagegen liegt diese Gesamt- ^{14}C -Aktivität etwa 2 bis 3 mal höher als in den Nukleinsäuren. In einer kleinen Übersicht sei dies veranschaulicht:

	Kontroll- tiere	Testosteron- behand. Tiere
Gesamt- ^{14}C -Aktivität (Zpm/Drüse)	320	4660
Gesamt- ^{14}C -Aktivität in DNS + RNS (Zpm/Drüse)	370	1580

Gorski (1963) beobachtete bei seinen Versuchen mit weiblichen Ratten nach Östrogengabe eine "dramatische" Ansammlung von RNS-Vorstufen im Uterusgewebe. Wir halten für wahrscheinlich, dass auch in unserem Fall der Grund für die Aktivitätsansammlung wenigstens zum Teil in einer zeitlich begrenzten Anhäufung von DNS-Vorstufen unter dem Einfluss von Testosteron zu suchen ist. Chang und Looney (1965) stellten darüberhinaus fest, dass Thymidin in der Ratte sehr schnell abgebaut wird, unter anderem zu β -Aminoisobuttersäure. Es ist daher möglich, dass nach Testosteronbehandlung ein beachtlicher Teil der ^{14}C -Aktivität, die bei den Versuchen zu Abb. 6 und 7 erfasst wurde, auf solche Abbauprodukte zurückzuführen ist. Über dieses Problem des Einflusses von Testosteron auf die Ansammlung von DNS-Vorstufen und von Metaboliten wird zur Zeit eine wissenschaftliche Arbeit angefertigt.

Die Tatsache, dass die DNS-Synthese durch Testosteron wesentlich langsamer als die RNS-Synthese gefördert wird, könnte Ausdruck einer in der Einleitung diskutierten Rückwirkung der verstärkten DNS-abhängigen RNS-Synthese auf die ebenfalls DNS-abhängige DNS-Synthese sein. Falls dies zutrifft, würde durch diesen Effekt die Karlson'sche Theorie gestützt.

Zusammenfassung

Der Einfluss von Testosteron auf die Aufnahme von $[2-^{14}\text{C}]$ -Thyminidin in die Vesikulardrüsen und einige andere Organe unreifer Sprague-Dawley-Ratten wurde studiert. Schon 18 Stunden nach einmaliger Testosterongabe wird die Aufnahme in die Vesikulardrüsen deutlich gesteigert. Extrapolation macht wahrscheinlich, dass Testosteron schon wesentlich früher auf den DNS-Stoffwechsel einwirkt. Aufnahme und Aufnahmesteigerung betreffen den Kern und die DNS.

Unter dem Einfluss von Testosteron ändert sich der Wassergehalt der Vesikulardrüsen nicht. Die Konzentration der RNS nimmt deutlich zu, die der DNS dagegen ab. Der Zuwachs der DNS-Menge pro Vesikulardrüse beträgt nur 25 % von dem der RNS-Menge. Grössen- und Gewichtszunahme der Vesikulardrüsen werden daher als Hypertrophie infolge Proteinvermehrung aufgefasst. Es wird vermutet, dass die durch Testosteron induzierte frühzeitige Aufnahme-steigerung von Thyminidin in die Vesikulardrüsen mit den Zellteilungsprozessen noch nicht in unmittelbarem Zusammenhang steht.

Unter gleichen Bedingungen fördert Testosteron auch die Aufnahme von $[2-^{14}\text{C}]$ Thyminidin in den Musculus levator ani, nicht jedoch in die Leber. 17 β -Hydroxy-1-methyl- Δ^1 -androstenon-(3) (Methenolon), ein anabol wirksames Steroid, fördert die Aufnahme von Thyminidin in die Vesikulardrüsen bei zehnfacher Dosis deutlich, jedoch nur halb so stark wie Testosteron.

Literatur

1. Adler, J. et al.: Proc. nat. Acad. Sci. 44, 641 (1958)
2. Allfrey, V.: In Brachet, J. u. A.E. Mirsky, The Cell, Vol. I, S. 193 Acad. Press, New York 1959
3. Beerman, W. und U. Clever: Sci. Am. 210, 50 (1964)
4. Bial, M.: Dtsch. Med. Wschr. 29, 253 u. 477 (1903)
5. Burton, K.: Biochem. J. 62, 315 (1956)
6. Butenandt, A., H. Hoppe Seyler's Ztschr. physiol. Chem. Günther u. F. Turba: 322, 28 (1960)
7. Chang, L.O. u. W.B. Looney: Cancer Res. 25, 1817 (1965)
8. Dirscherl, K. u. K. Kropp: Vitamine u. Hormone (Leipzig) 5, 280 (1944)
9. Dische, Z.: In Chergaff, E. u. G.N. Davidson, The Nucleic Acids, Vol. I, S. 285, Acad. Press, New York, 1955
10. Drews, J. u. A. Wacker: Zum Wirkungsmechanismus der Steroidhormone, unveröffentlichte Arbeit, S. 11 (1967)
11. Furguson, L.A. u. I.G. Wool: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 110, 529 (1962)
12. Hamilton, T. u. C.G. Müller: Arch. Biochem. Biophysics, 102, 21 (1963)
13. Hamilton, T.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 51, 83 (1964)
14. Harbers, E.: Die Nukleinsäuren, S. 117, Thieme Verlag, Stuttgart 1964
15. Harbers, E. u. C. Heidelberger: J. biol. Chem. 234, 1249 (1959)
16. Hoagland, M.B. et al.: J. biol. Chem. 231, 241 (1958)
17. Jacob, F. u. J. Monod: J. Mol. Biol. 3, 318 (1961)
18. Karlson, P.: Dtsch. Med. Wschr. 86, 668 (1961)
19. Karlson, P.: Persp. Biol. Med. 6, 203 (1963)
20. Kassenaar, A.A.H., A. Querido u. A. Haak: Protein Metabl. Intern. Sympos., Leiden (1962) S. 222
21. Kelly, R.C., E.A. Pets et al.: Anal. Biochem. 2, 267 (1961)
22. Kidson, C. u. S. Kirby: Nature 203, 599 (1965)

23. Kochakian, Ch. u. B.G. Harrison: Endocrinology 70, 99 (1962)
24. Mann, T.: The Biochemistry of Semen, S. 311, Methuen London u. John Wiley, New York (1964); W. Fleischmann u. S.K. Fleischmann, J. MT. Sinai Hospital 19, 228 (1952)
25. Mejbaum, J.: Hoppe Seyler's Ztschr. f. physiol. Chem. 258, 117 (1939)
26. Nass: Biochim. biophysica Acta 145, 1 (1967)
27. Niklas, A., E. Quinke, W.Maurer u. H. Neyen: Biochem. Z. 330, 1 (1958)
28. Ogur, M. u. G.Rosen: Arch. Biochem. Biophysics 25, 262 (1950)
29. Rudolph, G.G. u. L.T. Samuels: Endocrinology 44, 190 (1949)
30. Schoenheimer, R.: The Dynamic State of Body Constituents, Harvard University Press, Cambridge, Mass. (1942)
31. Schoenheimer, R., S. Ratner u. D. Rittenberg: J. Biol. Chem. 130, 703 (1939)
32. Schöniger, W.: Mikrochim. Acta (Wien) 1, 123 (1955)
33. Schmidt, G. u. S.J. Thannhauser: J. Biol. Chem. 161, 83 (1945)
34. Sekeris, C.E.: In Karlson, P. Mechanisms of Hormone Action, Thieme, Stuttgart 1965, S. 156
35. Simon, H., H. Daniel u. K. Klebe: Angew. Chem. 71, 303 (1959)
36. Wool, I.G.: Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 68, 28 (1963)

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Karl-Oskar Mosebach möchte ich herzlich für die Überlassung des Themas und die eingehende wissenschaftliche Beratung danken.

Lebenslauf

Am 29. Dezember 1940 wurde ich in Köln geboren. Die Volksschule besuchte ich in Marienheide, das Gymnasium in Gummersbach und Wipperfürth, wo ich 1961 die Reifeprüfung ablegte. Ich studierte Medizin in Würzburg, Berlin und Bonn. Am 20. 9. 1967 bestand ich die ärztliche Prüfung an der Universität Bonn. Als Medizinalassistent war ich an einer psychiatrischen und einer chirurgischen Abteilung beschäftigt und arbeite zur Zeit an der Medizinischen Universitäts-Poliklinik in Bonn.

